

Rec'd PCT/PTO 07 OCT 2005

PCT/JP 2004/005061

10/552369

08.4.2004-

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 4 月 9 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 1 0 5 4 9 3
Application Number:

[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 1 0 5 4 9 3]

出 願 人 財団法人化学及血清療法研究所
Applicant(s):

REC'D 03 JUN 2004

WIPO

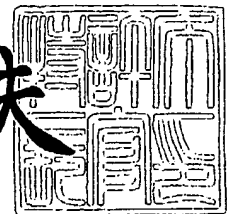
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 5 月 2 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



Best Available Copy

出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 4 1 9 9 8

【書類名】 特許願

【整理番号】 JP439YS

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 38/00
C07K 1/18

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号 財団法人化学及血清療法研究所内

【氏名】 前村 公太

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号 財団法人化学及血清療法研究所内

【氏名】 早瀬 啓洋

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号 財団法人化学及血清療法研究所内

【氏名】 田川 力一

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号 財団法人化学及血清療法研究所内

【氏名】 谷川 久

【特許出願人】

【識別番号】 000173555

【住所又は居所】 熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号

【氏名又は名称】 財団法人 化学及血清療法研究所

【代表者】 内野 矜自

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 056568

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ウイルス除去膜濾過工程の前処理方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 アルブミン含有水溶液のウイルス除去膜を用いた濾過工程に先立ち実施される、当該アルブミン含有水溶液を陰イオン交換体及び/またはプレフィルターにより処理することからなる前処理方法。

【請求項 2】 前記濾過工程に使用されるウイルス除去膜が除去サイズ 10～20 nm の孔径を有するものである請求項 1 記載の前処理方法。

【請求項 3】 前処理に使用されるプレフィルターが除去サイズ 35～200 nm の孔径を有するものである請求項 1 または請求項 2 に記載の前処理方法。

【請求項 4】 ウイルス除去膜を用いる濾過工程及び請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載の前処理方法を含んでなるアルブミン製剤の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本願発明は、医療用医薬品の分野に関する。詳細には、血漿分画製剤の一種である血清アルブミン製剤の製造方法に関する。さらに詳細には、ウイルス除去膜濾過工程が組み込まれたアルブミン製剤の製造方法において好ましい効果をもたらす、前記ウイルス除去膜濾過工程の前処理方法に関する。

【0002】

【従来の技術並びに発明が解決しようとする課題】

アルブミンは分子量 6.9 万の蛋白質で、585 個のアミノ酸からなる楕円状の分子である。血清アルブミンは全蛋白質中の約 6 割を占める血漿中に最も多く含まれる蛋白質であって、生体内では肝臓で合成される。そして、血液中で血漿膠質浸透圧の維持、毒物の中和や酸塩基平衡の維持に関与しており、また多くの薬物や化合物と非特異的に結合し、それらを運搬する役割を担う。

上記アルブミンを製剤化したアルブミン製剤は、火傷、ネフローゼ症候群等によるアルブミン喪失およびアルブミン合成能低下による低アルブミン血症、出血性ショックなどの治療に用いられている。

アルブミン製剤（加熱人血漿蛋白を含む）は、蛋白質濃度が4.4～25%（アルブミン含量が80%以上もしくは96%以上）という高濃度の蛋白質製剤である。また、製剤1本あたりの容量も20～250mLと大量であり、その製造においては大量かつ大容量の蛋白質を処理することが求められる。

【0003】

ところで、蛋白、特に生体由来の蛋白、より具体的には血液由来の蛋白は、エイズウイルス、各種肝炎ウイルス、ヒトパルボウイルスB19などの種々のウイルスに汚染されている可能性は否定できない。従って、これらを原料とした薬剤の製造の際には、ウイルスを十分に除去または不活化する工程を組み込むことが必須である。

血液由来の製剤、即ち血液製剤に夾雑する可能性を否定できないウイルスを不活化する方法としては、加熱処理法が汎用されている。その他、特殊な溶媒と洗浄剤を用いるソルベントディタージェント法（SD法）等もウイルス不活化の方法として採用され得る（特許文献1を参照）。また、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーによってもウイルスの除去が可能である（非特許文献1を参照）。しかし、これらいずれの方法も一長一短があり、単独の方法での各種ウイルスの完全不活化、完全除去は期し難く、従って複数の方法を組み合わせて用いることが有効であると考えられている。

【0004】

アルブミン製剤は、液状加熱（60℃、10時間）及びアルコール分画によるウイルス不活化/除去が施されており、そのウイルスに対する安全性は50年来の臨床使用により実証されている。しかし、さらなる安全性の観点から、これらの工程を経ても不活化/除去されないウイルス等の病原体、または発見されていない未知のウイルス等病原体への対策として、ウイルス除去膜濾過導入によるウイルス等病原体の除去が検討されているが、未だ実際の商業的規模での製造工程においてアルブミン製剤に導入された例はない。

【0005】

ウイルス除去膜濾過は、除去膜の孔径よりも大きなサイズを有するウイルス等病原体を製造工程で製剤から排除しようとするものである。しかし、蛋白質溶液

からの膜によるウイルス等病原体除去における大きな問題は、膜が目詰まりを起こして、濾過が困難になるか、不能になる点である。特に、小孔径（10～20 nm）のウイルス除去膜での濾過においては、この目詰まり防止が課題となる。加えて、アルブミン製剤の製造工程にウイルス除去膜濾過を導入する場合には、他の血漿蛋白製剤に比べて処理すべき蛋白質量が膨大であることから、ウイルス除去膜の使用数量（濾過面積）及びそれに要するコストの問題が導入のポイントとして挙げられる。つまり、ウイルス除去膜濾過工程導入にあたっては、高価なウイルス除去膜の使用数量をできるだけ少なく抑えることができる条件を見出すことが、工業的な応用には必須である。

【0006】

【特許文献1】

特開昭60-051116

【非特許文献1】

Developments in Biological Standardization, Vol., 81, 199～209 (1993)

【0007】

【課題を解決するための手段】

これまで、アルブミン製剤においてウイルス除去膜濾過工程の良好な濾過条件が示されていないことから、本願発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、目詰まりの原因となる、ウイルス除去膜の孔径以上の大きさの夾雑蛋白質をウイルス除去膜濾過前に除去又は低減化することで、良好な濾過が可能であることを見出し、本願発明を完成した。

本願発明は、アルブミン含有水溶液をウイルス除去膜で濾過する場合、目詰まりの原因となる夾雑蛋白質を、陰イオン交換体での荷電に基づく分離除去及び／またはプレフィルター（除去サイズ35～200 nm）でのサイズに基づく分離除去によって前処理した上でウイルス除去膜濾過を行うことを特徴とする。

【0008】

アルブミン溶液中には、ハプトグロビン、トランスフェリンやヘモペキシン等の他の蛋白質、並びにアルブミン自身の凝集体が夾雑蛋白質として含まれており

、これらが目詰まりの原因となる。ウイルス除去膜濾過を行う前に、アルブミン溶液に対して陰イオン交換体処理及び／もしくはプレ濾過（除去サイズ35～200 nm）による前処理を実施し、夾雑蛋白質を除去又は低減化することで、ウイルス除去膜濾過時の目詰まりを抑制することができ、大きな流速低下を伴わないアルブミン溶液の小孔径ウイルス除去膜（10～20 nm）での濾過をも可能とし、これによりウイルス除去膜の使用数量も削減され、アルブミン製剤製造での好適な工業的適用をもたらす。

【0009】

本願発明に係る製剤の主成分であるアルブミンの由来には、特に制限がなく具体的には哺乳動物、例えばヒト、ウシ、ウサギ等に由来するもの、細胞培養に由来するもの等が挙げられ、特にヒト由来のものが使用される。例えば、コーン氏の冷アルコール分画によって得られた第V画分等が例示される。

【0010】

本願発明の主たる要件は、ウイルス除去膜を用いた濾過工程に先立って実施される前処理工程であり、陰イオン交換体による前処理またはプレ濾過による前処理並びにこれらを組み合わせることよりなる。各々の前処理単独によっても相応の効果は得られるが、組み合わせることによってその効果は増長される。各前処理の具体的な態様は、以下のとおりである。

①陰イオン交換体による前処理の方法

pH、電気伝導度及び蛋白質濃度を調整したアルブミン含有水溶液を、適切な緩衝液で平衡化された陰イオン交換体に展開し、当該溶液中に含まれる夾雑蛋白質をこれに吸着させることにより除去する。使用する陰イオン交換体は、陰イオン交換基を有する不溶性担体であれば使用でき、具体的には、DEAE-セファロース（アマシャム・ファルマシア）、Q-セファロース（アマシャム・ファルマシア）、DEAE-トヨパール（東ソー）、QAE-トヨパール（東ソー）等が例示される。好ましくは、Q-セファロースやQAE-トヨパールの強陰イオン交換体が挙げられる。

【0011】

②プレ濾過による前処理の方法

pH及び蛋白質濃度を調整したアルブミン含有水溶液を、プレフィルター（除去サイズ35～200 nm）に通液し、目詰まりの原因と考えられる35～200 nm以上の大きさの蛋白質粒子をこれに捕捉させることにより除去する。使用するプレフィルターとしては、カートリッジ型フィルター（ザルトリウス社、ザルトポア2、0.1 μ m）、中空糸フィルター（旭化成、マイクロザ、0.1 μ m）、多孔膜中空糸（旭化成、プラノバ、35 nm）等が例示される。好ましくは、ザルトポア2やプラノバ35 nmが挙げられる。

【0012】

前処理を施されたアルブミン含有水溶液は、次にウイルス除去膜による濾過工程に付される。ここで用いられるウイルス除去膜としては、10～20 nmの孔径を有するウイルス除去膜が好ましい。この要件を満たすウイルス除去膜であれば特段の制約はないが、例えば、プラノバ15 N（旭化成）、ウルチポアVF-DV20（ポール）、バイアソルブNFP（ミリポア）等の製品名で市販されている除去膜は好適な例として挙げられる。

【0013】

【発明の効果】

アルブミン溶液のウイルス除去膜による濾過において、本願発明の陰イオン交換体及び／またはプレ濾過での前処理により、溶液の化学的条件を操作せずに、濾過面積あたりの濾過量の増加という効果が得られる。つまり、少ない濾過面積で大量のアルブミン溶液を濾過できるということから、アルブミン製剤製造へのウイルス除去膜濾過の導入に関して、工業的規模での適用を可能とする。

ウイルス除去膜濾過工程及びそれに先立つ本願発明の前処理工程が組み込まれたアルブミン製剤の製造方法によれば、これまでのアルコール分画と加熱処理でのウイルス除去/不活化に加えて、ウイルス除去膜濾過という新しい機序でのウイルス除去工程が可能となり、得られたアルブミン製剤は、より安全性に優れた製剤として提供できる。

【0014】

以下に、調製例、実施例に従って本願発明を詳説するが、本願発明はこれら実施例に何等限定されるものではない。

【0015】

【実施例】

調製例

(アルブミン製剤の調製)

①アルブミン含有水溶液の調製

コーン氏のアルコール分画によって得られた第V画分ペーストに、注射用水（日局）をペースト重量の2倍以上加え攪拌溶解し、限外濾過法により脱アルコールしたアルブミン画分を、pH 4～5（好ましくは4.4～4.6）、EC 5 mS/cm以下（好ましくは1.5 mS/cm以下）、蛋白濃度5～15 w/v%（好ましくは8～12 w/v%）に調整した。

【0016】

②陰イオン交換体による前処理の方法

pH 4～5（好ましくは4.4～4.6）、EC 5 mS/cm以下（好ましくは1.5 mS/cm以下）の酢酸バッファーで平衡化した陰イオン交換体（例えば、DEAE-セファロース（アマシャム・ファルマシア）、Q-セファロース（アマシャム・ファルマシア）、DEAE-トヨパール（東ソー）、QAE-トヨパール（東ソー））に、前記①で調製されたアルブミン含有水溶液を展開し、素通り画分を回収した。

【0017】

③フィルターによる前処理の方法

35～200 nmのサイズ排除が可能なフィルターを用いて、蛋白濃度5～15 w/v%（好ましくは6～10 w/v%）、pH 6～7.5（好ましくは6.6～7.2）に調整されたアルブミン含有水溶液を濾過し、回収した。

【0018】

④ウイルス除去膜への通液

ウイルス除去膜（旭化成、プラノバ15 nm）をpH 5～7となるように平衡化し、上記②及び／もしくは③の前処理を施し、蛋白質濃度8%、pH 7に調整したアルブミン含有溶液を、前記ウイルス除去膜に定圧濾過した。終了後、ウイルス除去膜内に残留したアルブミンを注射用水で回収した。

【0019】

実施例 1

(本願発明前処理の効果の確認)

陰イオン交換体処理及び/またはプレ濾過による効果を確認するために、調製例の①により得られるアルブミン含有水溶液を、本願発明による前処理の1) 陰イオン交換体 (Q-セファロース (アマシャム・ファルマシア)) 処理のみ、2) プレ濾過 (カートリッジ型フィルター (ザルトリウス社、ザルトポア 2、0.1 μm)) 処理のみ、及び3) 陰イオン交換体 (Q-セファロース (アマシャム・ファルマシア)) とプレ濾過 (カートリッジ型フィルター (ザルトリウス社、ザルトポア 2、0.1 μm)) を組み合わせた前処理、並びに比較例として4) 未処理のアルブミン溶液をそれぞれ蛋白濃度 8% となるように注射用水 (日局) で調整し、1 w/v % 水酸化ナトリウム溶液で pH を 6.98 に調整し、ウイルス除去膜 (旭化成、プラノバ、15 N) を用いて 0.5 kgf/cm² の定圧濾過を実施した。結果、各濾過の流量を単位膜面積あたりのアルブミン通液重量で表した結果を図 1 に示す。

図 1 から明らかなように未処理のアルブミン溶液の濾過に比べ、本願発明による前処理を実施したアルブミン溶液の濾過量に増加効果があることが判明した。特に、陰イオン交換体とプレ濾過処理を組み合わせると、未処理のアルブミン溶液に比べて約 2 倍以上のアルブミンの濾過が可能であることが判明した。

【0020】

実施例 2

(いくつかの除去膜による不純蛋白質の除去及び低減化効果の確認)

プレフィルターのタイプ毎の濾過流量の効果を比較確認するために調製例の②により得られるアルブミン含有水溶液を、本願発明によるプレ濾過処理として1) カートリッジ型フィルター (ザルトリウス社、ザルトポア 2、0.1 μm)、2) 中空糸フィルター (旭化成、マイクロザ、0.1 μm)、及び3) 多孔膜中空糸 (旭化成、プラノバ、35 nm) を前処理として実施したアルブミン溶液、並びに比較例として4) 未処理のアルブミン溶液をそれぞれ蛋白濃度 8% となるように注射用水 (日局) で調整し、1 w/v % 水酸化ナトリウム溶液で pH を 6.98 に

調整し、ウイルス除去膜(旭化成、プラノバ15N)を用いて0.5 kgf/cm²の定圧濾過を実施した。結果、各濾過の流量を単位膜面積あたりのアルブミン通液重量で表した結果を図2に示す。図2から明らかなように陰イオン交換体といずれのタイプのプレフィルターを組み合わせても濾過面積あたりの濾過量の増加という効果が得られることが判明した。特にカートリッジ型フィルター(ザルトリウス社、ザルトポア2、0.1 μm)、多孔膜中空糸(旭化成、プラノバ、35 nm)で濾過流量の増加効果が大きいことが判明した。

【図面の簡単な説明】

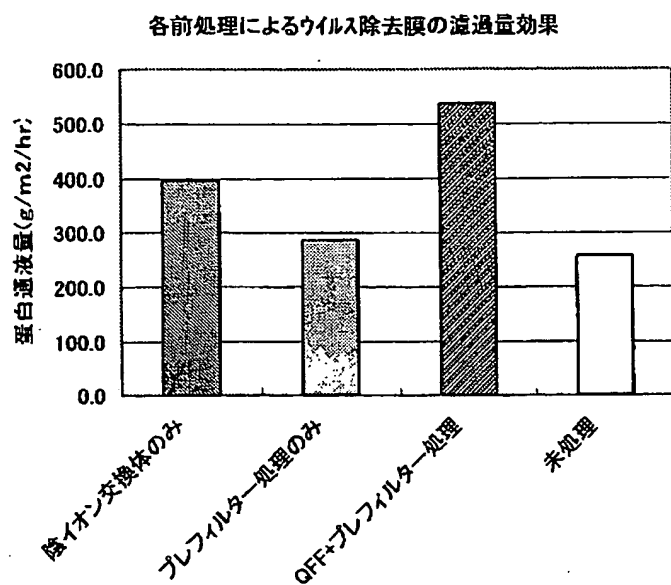
【図1】 本願発明によってもたらされるアルブミン製剤の製造方法に組み込まれたウイルス除去膜を用いた濾過工程における、各種前処理を施した場合の濾過特性(濾過量の効果)を示す図である。

【図2】 本願発明によってもたらされるアルブミン製剤の製造方法に組み込まれたウイルス除去膜を用いた濾過工程における、タイプ別のプレ濾過の濾過流量効果を示す図である。

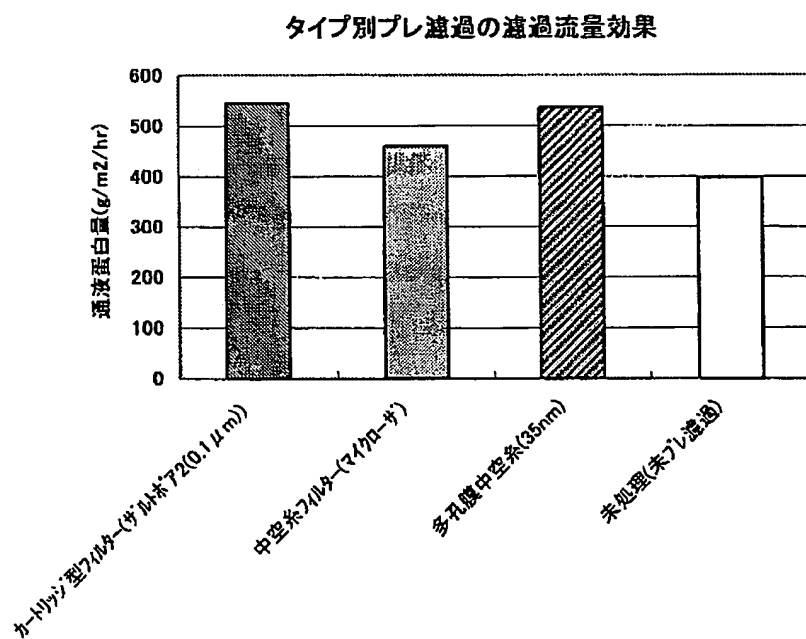
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【目的】 アルブミン製剤の製造方法における、アルブミン含有水溶液のウイルス除去膜を用いた濾過工程に先立ち実施される前処理工程を提供する。

【構成】 血清アルブミン含有水溶液を、好適には10～20 nmの孔径を有するウイルス除去膜で除去する工程に付す前に実施される当該アルブミン含有水溶液を陰イオン交換体及び/またはプレフィルターにより処理することからなる前処理方法。これにより、より安全性、安定性に優れたアルブミン製剤を効率的に製造することができる。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-105493
受付番号	50300589287
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 4月10日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年 4月 9日

次頁無

特願 2003-105493

出願人履歴情報

識別番号

[000173555]

1. 変更年月日

1996年 3月 4日

[変更理由]

住所変更

住 所

熊本県熊本市大窪一丁目6番1号

氏 名

財団法人化学及血清療法研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.